

# 実規模施設の牛ふんコンポスト化過程における真正細菌および古細菌の群集構造

著者	山本 希
号	46
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第986号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/60176">http://hdl.handle.net/10097/60176</a>

やまもと のぞみ

氏名（本籍地） 山 本 希

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 986 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 22 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科資源生物科学専攻

論 文 題 目 実規模施設の牛ふんコンポスト化過程における真正細菌および古細菌の群集構造

博士論文審査委員 （主査）教 授 中 井 裕

准教授 伊 藤 豊 彰

教 授 阿 部 敬 悦

准教授 多 田 千 佳

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

家畜排せつ物は廃棄物法により産業廃棄物として指定されており、日本国内における発生量は年間約 8700 万トンに上る（環境省 2008）。家畜排せつ物を肥料として用いる場合、直接土壌に投入すると悪臭の発生、病原性生物の残存、有機物の急激な分解による土壌の異常還元、生育阻害物質の産生、窒素飢餓などを引き起こすためコンポスト化処理を行ってから使用するのが一般的である（Harada 1992）。コンポスト化により有機物が分解され肥料成分が増加するほか、ふん尿に含まれる病原性微生物や寄生虫の卵、植物種子などが死滅する、などの利点がある。とくに牛ふんはコンポスト化による処理が多く用いられている（Haga 1999）。

コンポスト化処理は 30 日～6 ヶ月間にわたるが、その間コンポストの温度、pH、水分量、アンモニア濃度などの環境因子は劇的に変化する（藤田 1993）。これらの変化は真正細菌、古細菌、真核生物で構成される微生物群集の代謝活動によってもたらされる。同時に微生物群集は環境の変化に対応して大きく遷移していると考えられており、微生物群集を詳細に解析することはコンポスト中に存在する微生物の生態を解明する上で非常に重要である。

コンポスト化過程ではおもに原核生物（真正細菌および古細菌）の代謝によって進むものと考えられている。コンポスト中の微生物のうち 90%以上が培養不可能であることから（糞ら 2005）、近年は分子生物学的手法が用いられている。真正細菌群集については家畜排せつ物のみならず、都市廃棄物など他の有機性廃棄物のコンポスト化過程でも研究が行われてきた。例えば既往の研究の原材料は都市廃棄物（Haruta et al. 2002）や食品廃棄物を模した人工基質（Beffa et al. 1996）が多い。これらに存在する微生物の種類や有機物の組成は家畜排せつ物とは異なるため、真正細菌群集も異なると考えられる。また実験室規模の密閉式リアクターは加温などを行っており、実規模施設での処理とは環境因子の変化や微生物群集構造が異なっていると思われる。一方実規模施設における家畜排せつ物のコンポスト化を研究した報告の多くは細菌種の特定制を行わず、群集構造をパターン化する簡易的な手法を用いている。細菌種の特定制を行った報告は Sasaki et al. (2009) のみであるが特定制した細菌数は非常に少ない。

また古細菌は真正細菌と同様原核生物であるが生化学的、系統学的に大きく異なる独自の生物群を形成しており（Woese et al. 1990）、高温、高塩濃度などの極限環境や嫌気環境に生息している。コンポストは最高温度が 70℃以上に達

し嫌気環境も存在する一種の極限環境であることから、処理過程を通して古細菌群集が存在していると思われるが古細菌群集に関する知見は非常に少ない。稲わらおよび家庭廃棄物のコンポストに嫌気性メタン生成古細菌（メタン菌）が存在することは報告されているが（Cahyani et al. 2004, Thummes et al. 2007）、牛ふんコンポストにおける報告はないため、群集の動態は不明である。

また近年、海洋で新たにアンモニア酸化能を有する古細菌（AOA）が発見された（Venter et al. 2004）。この発見は、真正細菌のアンモニア酸化細菌（AOB）のみが独立栄養性のアンモニア酸化を行う、というこれまでの知見に新しい見解を与えた。その後土壌、水田、海洋では AOB より存在量が多いことも報告された。さらに高温の温泉、人工環境である活性汚泥にも AOA が存在し、AOA の生息域が非常に広範囲であることが示された（Prosser and Nicol, 2008）。このことから AOA は環境のアンモニア酸化に大きく関わっている可能性が高い。コンポストにおいてもアンモニア酸化反応が起こっており、肥料成分の 1 つである硝酸生成の初期反応として重要である。牛ふんコンポストにおける AOB 群集の存在は報告されているが（Yamada et al. 2007）、AOA については他の原料においてもまったく研究されていない。コンポスト中のアンモニア酸化反応機構を正確に理解する上で、AOA の存在の有無、存在量を明らかにすることが必要である。

そこで本研究では、実規模施設において牛ふんコンポスト化過程での真正細菌および古細菌群集構造の変化を分子生物学的手法で解析し、コンポスト化過程に存在する微生物群集に関する知見を得ることを目的とした。また、コンポストにおける AOA の存在を調査し、その群集構造と存在量を明らかにした。

## 第 2 章 実規模施設の牛ふんコンポスト化過程における真正細菌群集構造解析

コンポストの初期水分量は酸素の供給量、すなわち好気状態の維持に影響を与える重要な因子である（藤田 1993）。つまり初期水分量は温度や酸素といった他の環境因子に大きく影響し、処理過程に存在する真正細菌群集にも影響を及ぼすと考えられる。

そこで本章では本学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センターの施設で牛ふんコンポスト化試験を行った。試験は初期水分量が異なる 3 区（高水分区、水分補正区、適正水分区）を設け攪拌処理（28 日間）と堆積処

理（84 日間）を行い、物理化学分析によりコンポスト化の進行を評価するとともに、真正細菌 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローニング法により真正細菌群集構造を解析した。

水分補正区および適正水分区は、高温（60℃以上）が維持され水分量が減少し、有機物分解が進行した（Fig. 1、Fig. 2、Fig. 3）。処理開始時の群集構造は全試験区でおもに Firmicutes 門、Bacteroidetes 門に属するクローンで構成されたが、20 日目からは水分補正区および適正水分区で両門の割合が減少し、Proteobacteria 門、Actinobacteria 門に属するクロンの増加が示された（Fig. 4）。また Bacteroidetes 門内では処理開始時に Bacteroidia 綱に分類されるクローンが優占したが、28 日目以降 Fravobacteria 綱、Sphingobacteria 綱に分類されるクローンが優占した（Fig. 5）。さらにふん便に由来する細菌に近縁なクローンが 20 日目以降ほとんど検出されず、土壌やコンポストに由来する細菌に近縁なクロンの割合が増加した（Fig. 6a）。一方高水分区では高温期（8 日目）以降もふん便および嫌気環境に由来する細菌に近縁なクローンが多数検出され、嫌気状態の維持が示唆された（Fig. 6b）。以上から初期水分量がコンポスト化過程における真正細菌群集構造の変化に影響し、高温期を境に門レベルでの遷移が見られ、消化管由来細菌の近縁種が減少して、土壌やコンポストに由来する細菌の近縁種の割合が増加した。

### 第 3 章 実規模施設の牛ふんコンポスト化過程における古細菌群集構造解析

本章では牛ふんコンポスト化過程における古群集の構造変化を明らかにするため、第 2 章で使用した施設で攪拌処理による牛ふんコンポスト化試験を 30 日間行った。物理化学分析によりコンポスト化過程の進行を評価するとともに、古細菌 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローニング法により古細菌群集構造を解析した。

試験は 60℃以上の高温が断続的に維持され水分量が減少した。また C/N 比の低下から有機物分解が進行したと考えられた（Fig. 7）。古細菌群集のクローンライブラリはおもに嫌気性のメタン菌および好気性の AOA で構成された。メタン菌は 10 日目までおもに *Methanosarcina* 属、*Methanomicrococcus* 属、*Methanocorpusculum* 属に分類され、温度や有機物量の変化に適応した多様なメタン菌が存在していると考えられた（Fig. 8）。16 日目以降は *Methanosarcina*

属がクローンの 40～50%を占め、とくに高温性 *M. thermophila* に近縁なクローンは 40℃以下の中温域での生存も示唆された (Fig. 9)。さらに既報の実規模施設を用いた家庭廃棄物コンポストに由来するメタン菌とも近縁だったため、実規模施設において材料が異なるコンポストに存在するメタン菌が共通する可能性が示された。

AOA は処理開始時から終了時まで存在し、AOA がコンポストに存在することが初めて示された (Fig. 8)。AOA 群集は 2 種で構成され、そのうち検出割合が多かった 1 種は最近縁種である *Nitrososphaera* 属 AOA と異なるクラスターに属し、系統学的に新しいグループに属する AOA であることが示唆され、コンポスト特有の AOA と考えられた (Fig. 10)。

#### 第 4 章 実規模施設の牛ふんコンポストにおける AOA 群集の調査と定量

第 3 章では牛ふんコンポスト化過程に AOA が存在することが明らかとなった。本章では牛ふんコンポスト化過程における AOA 群集構造と存在量を明らかにするため、複数の施設のコンポストにおいて古細菌 *amoA* (アンモニア酸化酵素) 遺伝子を標的とした AOA 群集構造の DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 解析とリアルタイム PCR による定量を行った。サンプルは第 3 章で作成したコンポスト (K1) および同施設で新たに作成したコンポスト (K2)、宮城県内の 4 施設 (S、N、TM、TS) で作成された牛ふんコンポストを用いた (Table 1)。

K1 では 8 日目から、K2 では 6 日目から、S では攪拌終了時 (約 25 日目) から、他の施設では終了時のサンプルから硝酸態窒素が検出され、アンモニア酸化反応を含む硝化反応が起こっていることが示唆された (Fig. 11a、11b、12、13)。DGGE 解析によりすべての施設の牛ふんコンポストに AOA が存在し、系統樹解析により施設 N 以外の AOA の最優占種は共通していることが示された (Fig. 14)。この種は既知の AOA と系統学的に距離があるため、コンポストで初めて検出された AOA であることが示され、第 3 章の結果を支持した。

AOA の存在量は K1 で 14 日目以降、K2 で 11 日目以降に定量可能となり、アンモニア酸化反応を含む硝化速度の上昇との関連が示された (Fig. 15a、15b)。古細菌 *amoA* 遺伝子の存在量は  $10^6$  コピー/g 乾重で、真正細菌 *amoA* 遺伝子の存在量よりも有意に多いか同程度だった。施設 S の古細菌 *amoA* 遺伝子の存在量は真正細菌 *amoA* 遺伝子の存在量よりも有意に多く、 $10^7$  コピー/g 凍結乾重だ

った (Fig. 16)。

以上より処理後半から終了時のコンポストには AOA が AOB より多く存在することが示唆され、牛ふんコンポスト化過程で起こるアンモニア酸化反応には AOB だけでなく AOA も重要な役割を果たしている可能性が示された。

## 第 5 章 総括

1. 初期水分量がコンポスト化過程における真正細菌群集構造の変化に影響し、コンポスト化が良好に進行した場合、高温期を境に門レベルでの遷移が見られ、土壌やコンポスト由来の細菌に近縁なクローンの割合が増加した。
2. コンポスト化過程の古細菌群集構造はおもにメタン菌および AOA で構成された。高温性 *Methanosarcina thermophila* に近縁なクローンは既報の実規模施設を用いた家庭廃棄物コンポストに由来するメタン菌とも近縁だったため、実規模施設において材料が異なるコンポストのメタン菌が共通する可能性が示された。
3. コンポスト中に AOA が存在することが初めて示された。
4. 検出された AOA は 2 種で、検出割合が高かった 1 種はコンポスト特有の AOA であることが示唆された。
5. AOA は解析したすべての施設で検出され、牛ふんコンポスト化過程に広く存在することが示された。多くの施設で優占する AOA 種は同一でコンポストに特有の AOA であることが示唆された。
6. 処理後半のコンポスト中の AOA の存在量は AOB より有意に多く、AOA がコンポスト化過程のアンモニア酸化反応に重要な役割を果たしている可能性が示された。

## 引用文献

1. Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL and Aragno M. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1723-1727
2. Cahyani VR, Matsuya K, Asakawa S and Kimura M. (2004) *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 555-563
3. 藤田 賢二. (1993) コンポスト化技術 廃棄物有効利用のテクノロジー 技報堂出版
4. 龚春明、越田淳一、井上興一、染谷孝. (2005) 日本土壤肥料科学雑誌 76: 401-410

5. Haga K. (1999) *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 12: 604-606
6. Harada Y. (1992) *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 5: 113-121
7. Haruta S, Kondo M, Nakamura K, Aiba H, Ueno S, Ishii M and Igarashi Y. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 224-231
8. McCaig AE, Glover LA and Prosser JI. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1721-1730
9. Prosser JI and Nicol GW. (2008) *Environ. Microbiol.* 10: 2931-2941
10. Sasaki H, Nonaka J, Kitazume O, Asano R, Sasaki T and Nakai Y. (2009) *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22: 113-118
11. Thummes K, Kämpfer P and Jäckel U. (2007) *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 418-429
12. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D and Eisen JA. (2004) *Science* 304: 66-74
13. Woese CR, Kandler O and Wheelis ML. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4576-4579
14. Yamada T, Miyauchi K, Ueda H, Ueda Y, Sugawara H, Nakai Y and Endo G. (2007) *J. Biosci. Bioeng.* 104: 408-415



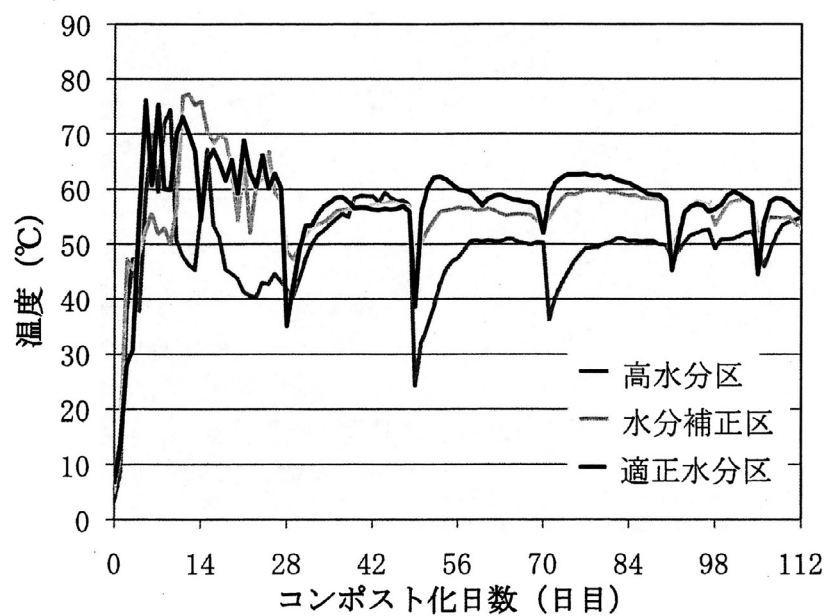


Fig. 1 各試験区の温度変化

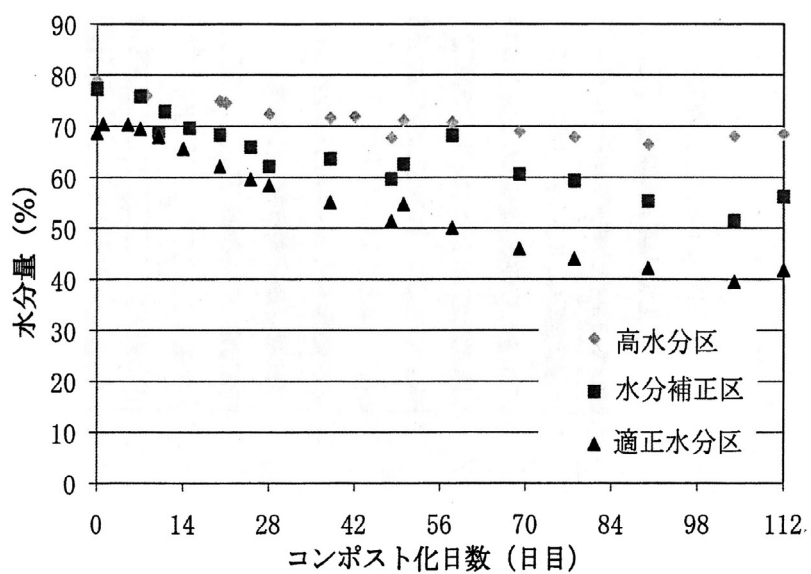


Fig. 2 各試験区の水分量の変化

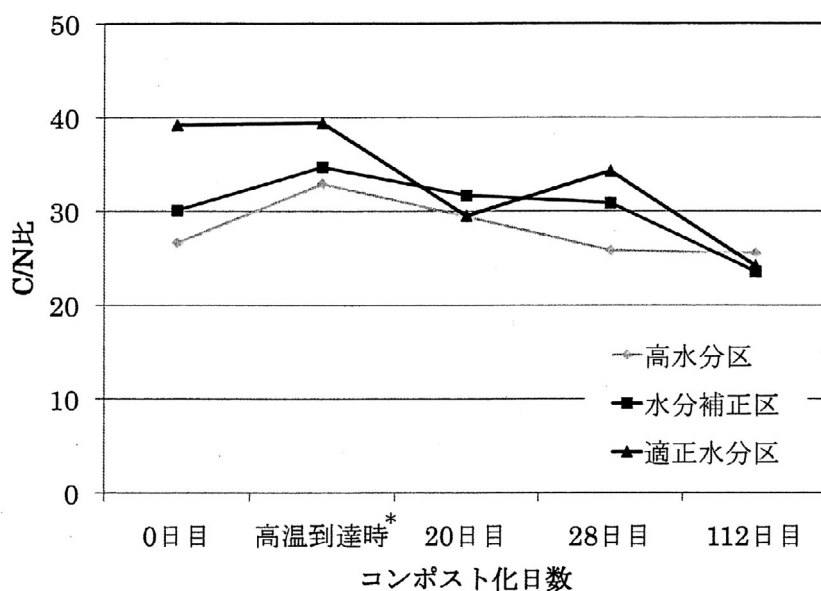


Fig. 3 各試験区の C/N 比の変化

\* : 8 日目 (高水分区)、11 日目 (水分補正区)、5 日目 (適正水分区)

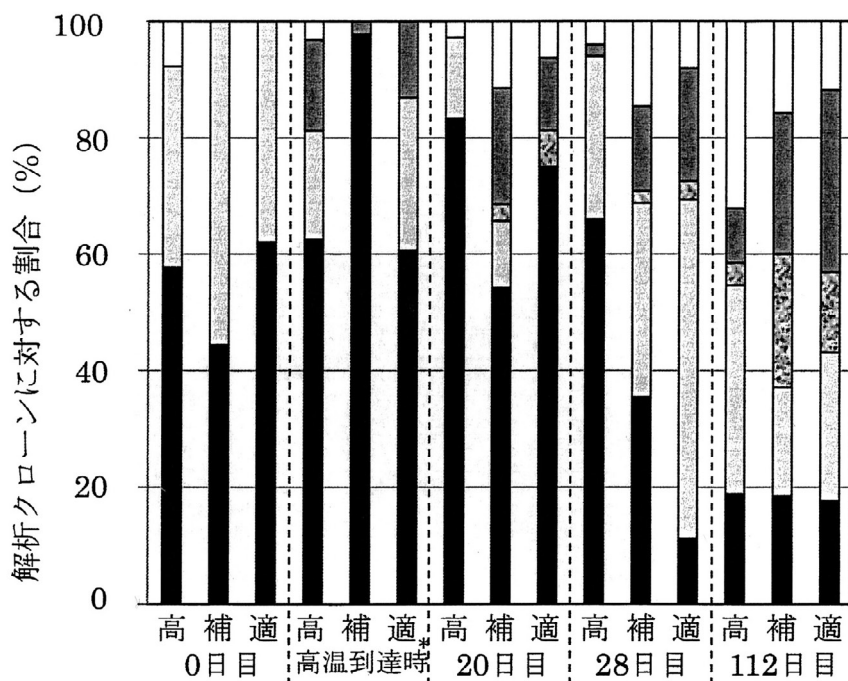


Fig. 4 各試験区における真正細菌のクローンライブラリ

高：高水分区、補：水分補正区、適：適正水分区

\* : 8 日目 (高水分区)、11 日目 (水分補正区)、5 日目 (適正水分区)

■ : Firmicutes門    □ : Bacteroidetes門    ▨ : Actinobacteria門  
 ▩ : Proteobacteria門    □ : その他の門

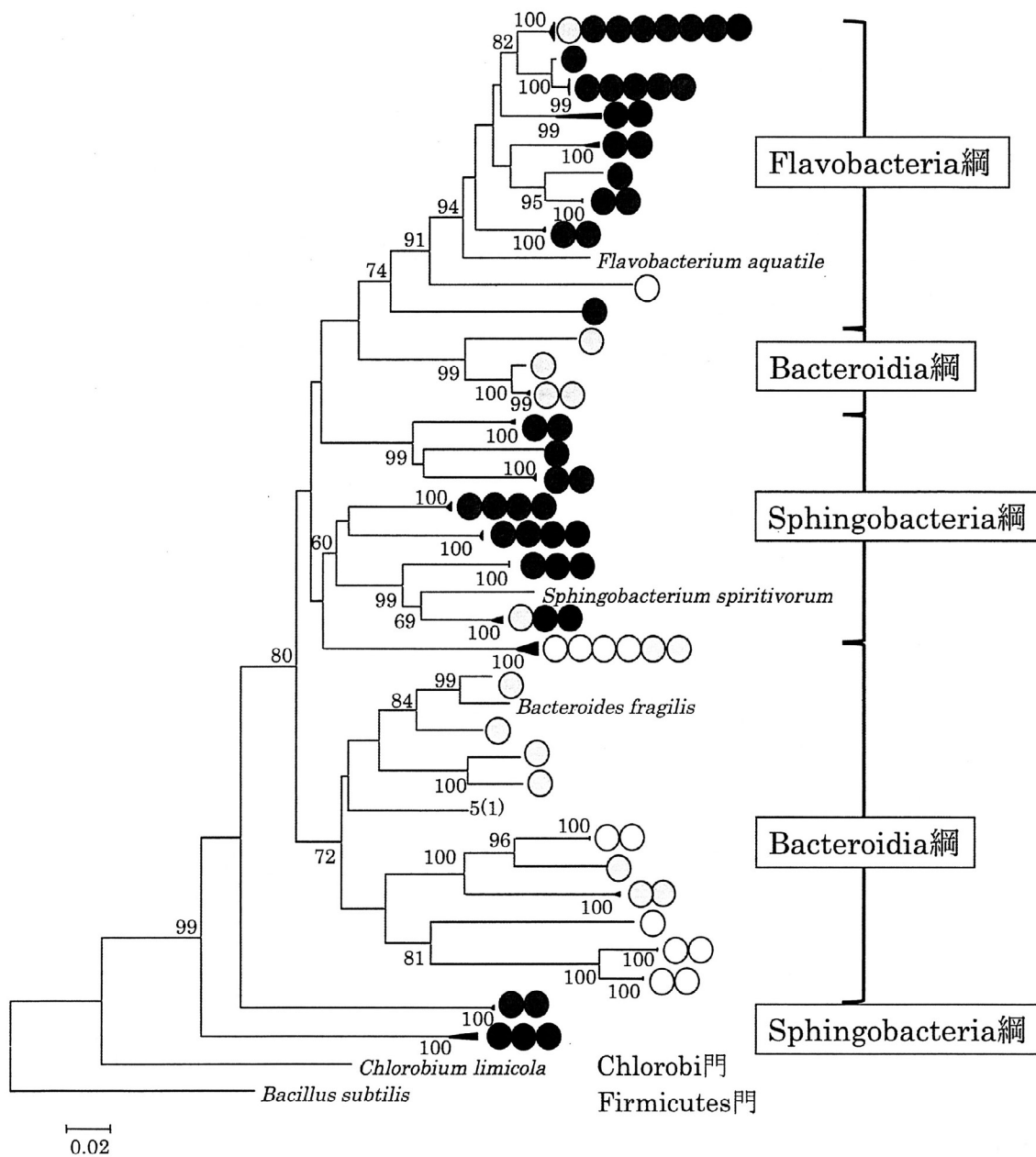


Fig. 5 適正水分区で Bacteroidetes 門に属するクローンの系統樹

系統樹は Neighbor-joining 法で構築した。

系統樹の分岐に記した数字はブートストラップ値を示す。

○:0日目 ○:8日目 ●:28日目 ●:112日目 (丸は得られたクローン数)

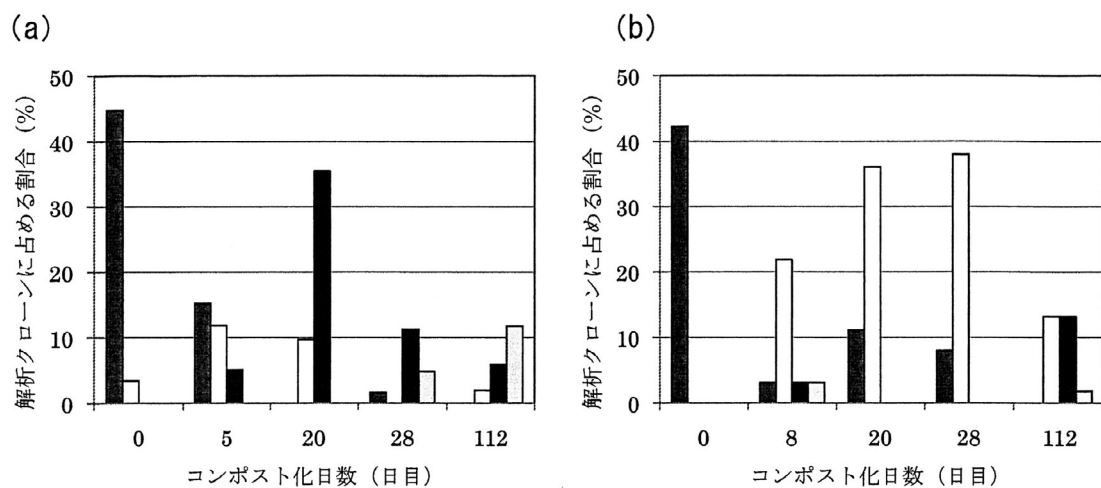


Fig. 6 (a) 適正水分区および (b) 高水分区のクローン近縁種の由来  
ただし近縁種との相同性が97%以上のクローンのみ算出した。(McCaig et al. 1999)

■:腸管、糞便 □:嫌気性消化槽 ■:コンポスト □:土壌

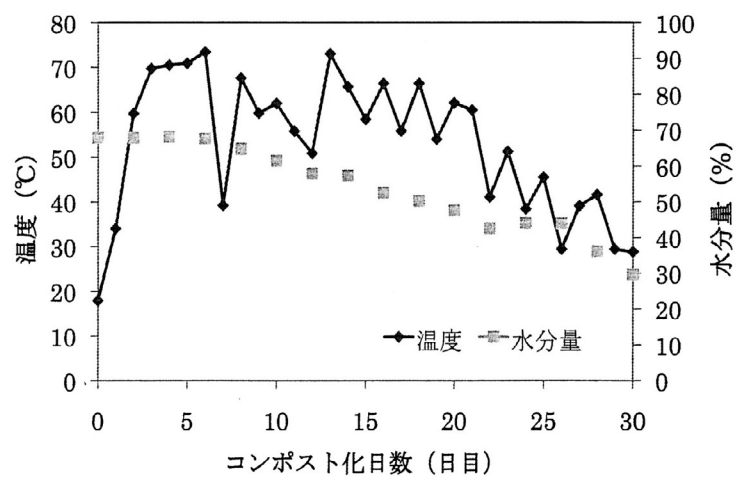


Fig. 7 温度および水分量の変化

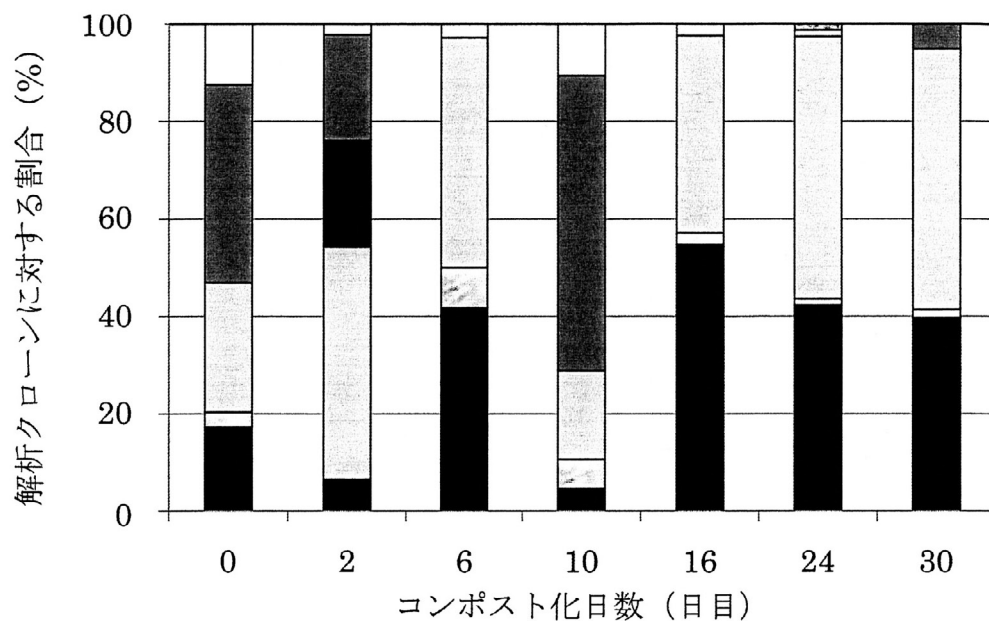


Fig. 8 古細菌のクローンライブラリ

■: *Nitrososphaera* spp.    □: Soil Crenarchaeota    □: *Methanosarcina* spp.  
 ■: *Methanocorpusculum* spp.    ■: *Methanomicrococcus* spp.    □: Other Methanogen  
 ■: Other Euryarchaeota

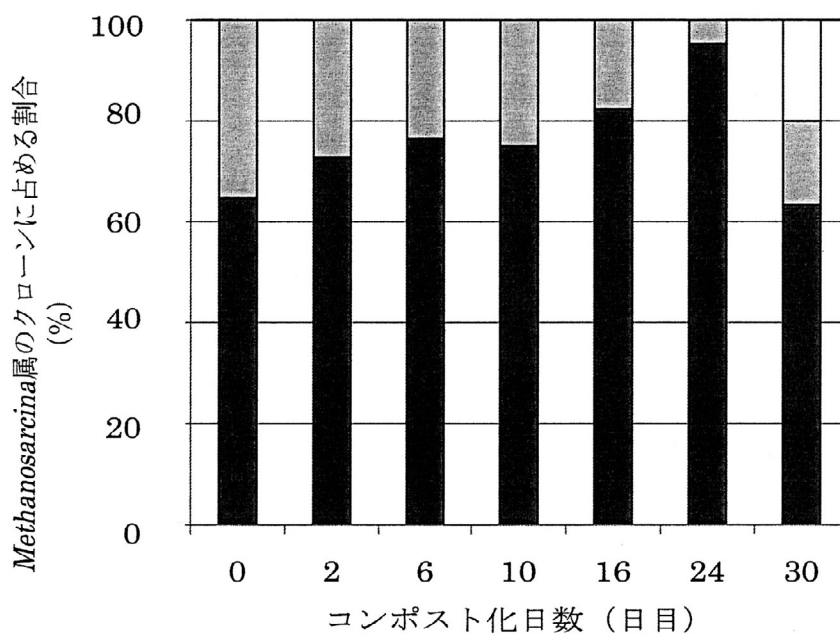


Fig. 9 *Methanosarcina* 属に分類されたクローンの近縁種

■: *Methanosarcina thermophila*    ■: *Methanosarcina mazei*  
 □: Uncultured *Methanosarcina* spp.



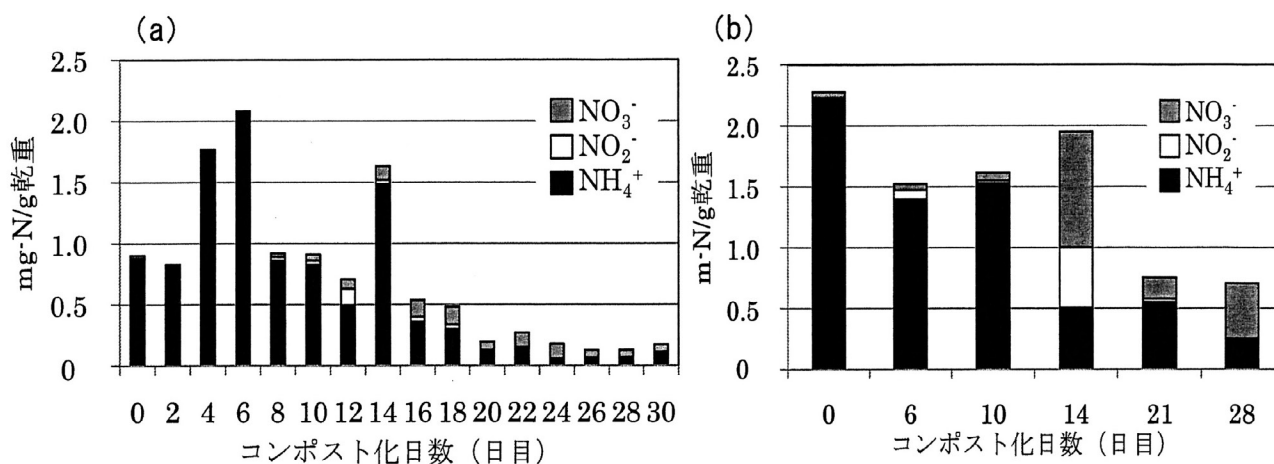


Fig. 11 施設 K のサンプル (a) K1、(b) K2 における無機態窒素濃度の変化

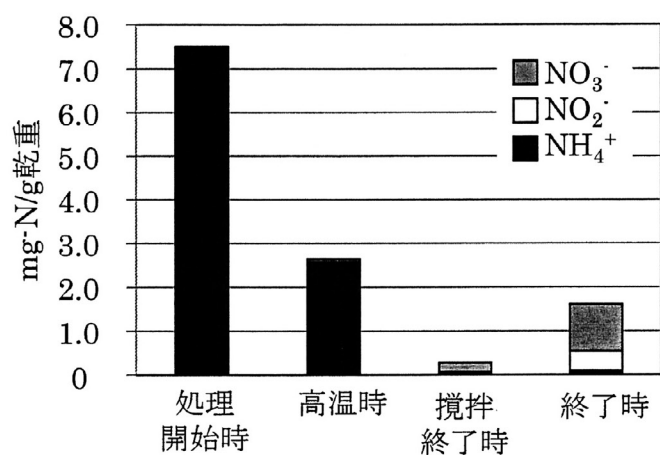


Fig. 12 施設 S のサンプルの無機態窒素濃度の変化

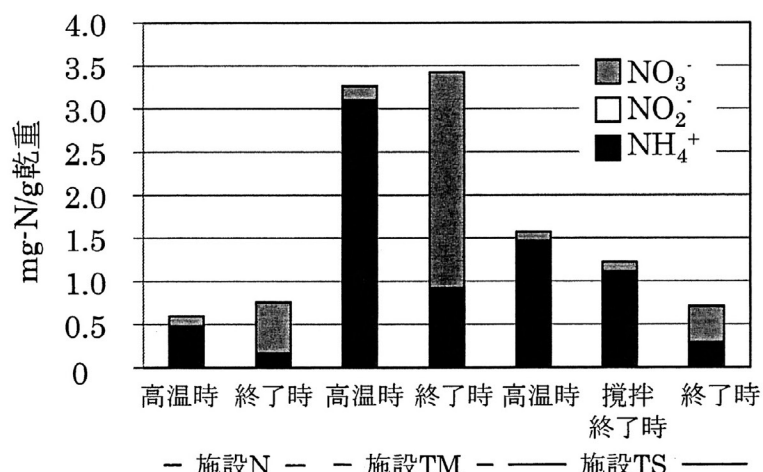


Fig. 13 施設 N、TM、TS のサンプルの無機態窒素濃度の変化



Fig. 14 古細菌 *amoA* 遺伝子の系統樹

系統樹は Neighbor-joining 法で構築した。アルファベットは各施設を示す。

系統樹の分岐に記した数字はブートストラップ値を示す。



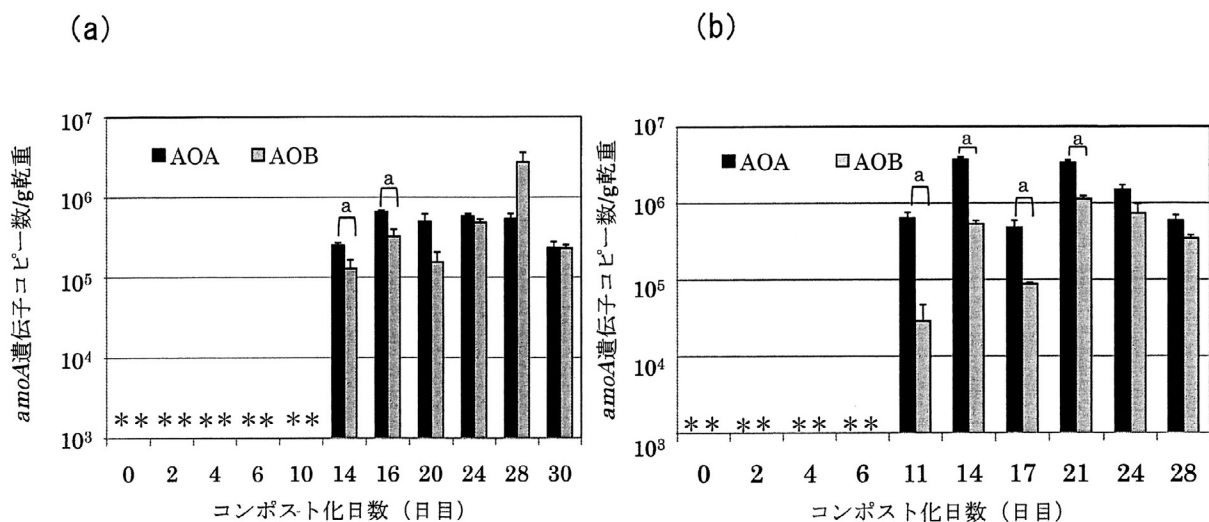


Fig. 15 施設Kのサンプル (a) K1、(b) K2 における AOA および AOB のリアルタイム PCR による定量

\* : 増幅効率が低いためデータ示さず、a : t 検定  $p < 0.05$ 、エラーバー : 標準偏差

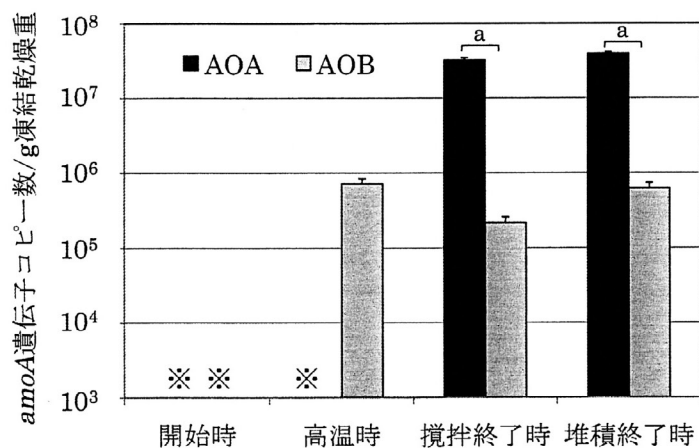


Fig. 16 施設Sのサンプルにおける AOA および AOB のリアルタイム PCR による定量

※ : 非特異的増幅、a : t 検定  $p < 0.05$ 、エラーバー : 標準偏差

## 論文審査結果要旨

コンポスト化は家畜排せつ物の一般的な処理・再利用方法である。コンポスト化は微生物の働きによって進行し、その過程において、温度、pH、水分量、酸素量などの環境条件が大きく変化する。これらの環境条件の変化によって微生物は影響を受け、微生物群集の構造は大きく遷移するとされている。しかし、実規模施設のコンポスト化過程におけるその詳細は不明であった。本研究では、実規模施設の牛ふんコンポスト化過程の原核生物の集団の構成を明らかにすることを目的として、群集構造の変化を複数の遺伝子解析手法を用いて解析した。

コンポスト化過程の進行にともなって、真正細菌群集は門レベルおよび綱レベルで遷移した。高温期まで Firmicutes 門が優占したが有機物分解の進行とともに減少し、以降は Proteobacteria 門、Actinobacteria 門が優占した。未培養種が近縁であった場合でも近縁種の由来を調査することによってコンポスト化過程の進行を評価できると考えられた。とくに嫌気性環境に由来する近縁種をもつ細菌や、コンポストや土壌に由来する近縁種をもつ細菌の優占は、コンポスト化の進行状況が嫌气的か、好气的かを判断する材料となり、コンポスト化の評価基準となると思われた。

古細菌群集の構成種とその構造変化を初めて明らかにした。コンポスト化の全過程において、嫌気性メタン生成古細菌が検出され、コンポストに存在する微細な嫌気環境においてメタン産生が行われる可能性が示された。好熱性 *Methanosarcina thermophila* に近縁なクローンが期間を通して検出され、好熱性メタン生成古細菌がコンポスト中の環境変化にもっとも適応した優占種と考えられた。さらにアンモニア酸化古細菌（AOA）が処理期間を通して存在することが初めて示された。検出された AOA は、既知の AOA と比べて、系統学的に独自のグループを形成し、牛ふんコンポスト環境に適応した特異な AOA であることが示唆された。この AOA は、他のコンポスト施設からも検出され、牛ふんコンポストに広く存在する特徴的な AOA であると考えられた。また、コンポスト中の AOA はアンモニア酸化真正細菌（AOB）よりも多いことを明らかにした。

本研究は、実規模施設におけるコンポスト化過程の微生物群集を詳細に観察したものであり、多くの新規で重要な知見を与えるものである。とくに AOA がコンポストに存在し、その数が AOB よりも多いことを初めて示した点は高く評価される。これらのことから、本論文は、博士論文に相応しいと結論された。